

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-511423

(P2003-511423A)

(43) 公表日 平成15年3月25日 (2003.3.25)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テロート [*] (参考)
A 6 1 K	47/48	A 6 1 K	47/48
	31/337		31/337
	31/427		31/427
	31/4745		31/4745
	47/42		47/42

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-529754(P2001-529754)
 (86) (22) 出願日 平成12年10月12日 (2000.10.12)
 (85) 優先文提出日 平成14年4月12日 (2002.4.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US00/28109
 (87) 国際公開番号 WO01/026693
 (87) 国際公開日 平成13年4月19日 (2001.4.19)
 (31) 優先権主張番号 60/159,135
 (32) 優先日 平成11年10月12日 (1999.10.12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 セル・セラピューティックス・インコーポ
 レーテッド
 Cell Therapeutics, I
 nc.
 アメリカ合衆国 ワシントン 98119, シ
 アトル, ウェスト, エリオット アベニュー
 501, スイート 400
 (72) 発明者 クマー, アニル, エム.
 アメリカ合衆国 98374 ワシントン州,
 プヤラップ, 13701-113 ティー・エイチ ス
 トリート コート イー.
 (74) 代理人 弁護士 山本 秀策 (外2名)

最終頁に続く

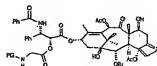
(54) 【発明の名称】 ポリグルタメート-治療薬コンジュゲートの製造

(57) 【要約】

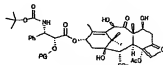
本発明は、臨床的開発および製薬の使用に適したポリグル
 タミン酸-治療薬コンジュゲートを調製する新規な方
 法およびこの方法によって調製されるポリグルタミン酸
 -治療薬コンジュゲートを提供する。



ポリグルタミン酸-ポリ(フェニルアセチレン)コンジュゲート



ポリグルタミン酸-ポリ(フェニルアセチレン)コンジュゲート



ポリグルタミン酸-ポリ(フェニルアセチレン)コンジュゲート

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリグルタミン酸と治療薬とのコンジュゲートを調製する方法であって、

(a)プロトン化形態のポリグルタミン酸ポリマーおよびそれとコンジュゲート化させる治療薬を提供すること、

(b)不活性有機溶媒中で該治療薬を該ポリグルタミン酸ポリマーに共有結合させてポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲートを形成すること、

(c)過剰容量の塩水溶液を添加することにより該ポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲートを溶液から沈殿させること、および

(d)該コンジュゲートをプロトン化固体として回収すること、を含んでなる、上記方法。

【請求項2】 ステップ(a)が、

(a.1)ポリ-L-グルタミン酸のナトリウム塩の水溶液を提供すること、

(a.2)該溶液を酸性化することにより該ポリ-L-グルタミン酸のナトリウム塩をプロトン化形態に変換してそれを溶液から沈殿させること、および

(a.3)このポリ-L-グルタミン酸沈殿を回収して該沈殿を水で洗浄すること、をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 ステップ(a)において前記治療薬が抗腫瘍薬である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記抗腫瘍薬が、バクリタキセル、ドセタキセル、エトボシド、テニボシド、エボテロン、ゲムシタピン、20(S)(+)カンプトテシン、9-アミノカンプトテシン、9-ニトロカンプトテシン、7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン、9-ジメチルアミノメチル-10-ヒドロキシカンプトテシン、10,11-メチレンジオキシカンプトテシン、7-メチルピベリジノメチル-10,11-エチレンジオキシカンプトテシン、フラボピリドール (flavopiridol)、ゲルダナマイシン、17-(アリアルミノ)-17-デメトキシゲルダナマイシン、エクテイナシジン743(ecteinascidin 743)、フタラシジン (phthalascidin)、CT-2584(1-(11-(ドデシルアミノ)-10-ヒドロキシウンデシル)-3,7-ジメチルキサンチン、CT-4582(1-(11-(N-メチルN-ドデシルアミノ)-10-ヒドロキシウンデシル)-3,7-ジメチルキサンチン)

、ドキソルピシン、7-(ジメチル-tert-ブチルシリルオキシ)-10-ヒドロキシカン
プトテシン、またはアドリアマイシノンから選択される、請求項3に記載の方法
。

【請求項5】 前記エボチロンが、エボチロンA、エボチロンB、エボチロン
C、エボチロンD、エボチロンFまたは12,13-ジオキシエボチロンFである、請求項
4に記載の方法。

【請求項6】 前記治療薬がバクリタキセルまたはドセタキセルである、請
求項4に記載の方法。

【請求項7】 ステップ(a)において、前記ポリグルタミン酸が、粘度によ
り決定した場合に20kd~80kdの分子量を有する、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 ステップ(b)において、前記治療薬が、生理学的に開裂可能
な結合によって前記ポリグルタミン酸のカルボキシ基に直接結合される、請求項
1に記載の方法。

【請求項9】 前記結合がエステル結合またはアミド結合である、請求項8
に記載の方法。

【請求項10】 前記結合がエステル結合である、請求項9に記載の方法。

【請求項11】 ステップ(b)において、前記治療薬が、リンカーを介して
前記ポリグルタミン酸のカルボキシ基に間接的に結合され、該リンカーが、生理
学的に開裂可能な結合によって前記ポリグルタミン酸および前記治療薬に結合さ
れる、請求項1に記載の方法。

【請求項12】 前記リンカーがアミノ酸である、請求項11に記載の方法
。

【請求項13】 ステップ(b)において前記ポリグルタミン酸-治療薬コンジュ
ゲートが約5~55重量%の治療薬を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項14】 前記コンジュゲートが約10~45重量%の治療薬を含む、請
求項13に記載の方法。

【請求項15】 ステップ(c)において前記塩水溶液が塩化ナトリウムを含
む、請求項1に記載の方法。

【請求項16】 前記塩水溶液が反応混合物溶媒の1.5~4倍容量で添加され

る、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 ステップ(c)において反応混合物を酸性化するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項18】 前記コンジュゲートから低分子量不純物を除去する処理をさらに含み、該除去をステップ(c)と(d)の間またはステップ(d)の後で行うことができる、請求項1に記載の方法。

【請求項19】 ポリグルタミン酸と治療薬とのコンジュゲートを調製する方法であって、

- (a)ポリグルタミン酸ポリマーの塩を不活性有機溶媒中に懸濁させること、
 - (b)この懸濁液に酸無水物を添加することにより該ポリマーをプロトン化して共役塩基の可溶性塩を形成すること、
 - (c)治療薬を提供し該治療薬を該ポリグルタミン酸ポリマーに共有結合させてポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲートを形成すること、
 - (d)過剰容量の塩水溶液を添加することにより該ポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲートを溶液から沈殿させること、および
 - (e)該コンジュゲートをプロトン化固体として回収すること、
- を含んでなる、上記方法。

【請求項20】 ポリ-L-グルタミン酸のナトリウム塩およびバクリタキセルからポリ-L-グルタミン酸-2'-バクリタキセルコンジュゲートを調製する方法であって、

- (a)ポリ-L-グルタミン酸のナトリウム塩の水溶液を提供すること、
- (b)該溶液を約2~4のpHに酸性化することにより、該ポリ-L-グルタミン酸のナトリウム塩をプロトン化形態に変換してそれを溶液から沈殿させること、
- (c)このポリ-L-グルタミン酸沈殿を回収して水で洗浄すること、
- (d)7~21重量%の含水率まで該ポリ-L-グルタミン酸を乾燥させること、
- (e)バクリタキセルの2'-OH基とポリ-L-グルタミン酸のカルボキシ基との間で形成されるエステル結合を介してバクリタキセルをポリグルタミン酸ポリマーにコンジュゲート化させるのに十分な時間にわたり、標準的なカップリング条件下で、ポリ-L-グルタミン酸をバクリタキセルに接触させること、

(f)この反応混合物に塩水溶液を徐々に添加しながら、この反応混合物を0℃～10℃に冷却すること、

(h)得られた懸濁液を酸性化すること、

(i)プロトン化固体としてコンジュゲートを回収すること、および

(j)該プロトン化固体から不純物を抽出すること、

を含んでなる、上記方法。

【請求項21】 ステップ(a)～(d)の代わりに以下のステップ(a')および(b'):

(a')不活性有機溶媒中のポリ-L-グルタミン酸ナトリウム塩の懸濁液を提供すること、および

(b')約0.95当量のトリフルオロ酢酸またはメタンスルホン酸を添加することによりポリ-L-グルタミン酸ナトリウムトリフルオロアセテートまたはポリグルタミン酸ナトリウムメタンスルホネートを含む溶液を形成すること、を行い、そして請求項20に記載のステップ(e)～(j)を行う、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 請求項1に記載の方法により調製されるポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲート。

【請求項23】 請求項19に記載の方法により調製されるポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲート。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、臨床の開発のためのポリグルタメート-治療薬コンジュゲートを量産する方法に関する。

【0002】

発明の背景

抗腫瘍薬パクリタキセルは、腫瘍を有する宿主にポリグルタミン酸コンジュゲートとして投与した場合、非コンジュゲート形態の該薬物と比較して増大した効能および減少した毒性を示す(米国特許第5,977,163号; Li et al., Cancer Res., 58:2404, 1998)。ポリグルタミン酸-パクリタキセルコンジュゲートは、増大した水溶性、身体からのより遅いクリアランス、および腫瘍中への増大した蓄積性を示す。ポリグルタミン酸と種々の他の治療薬とのコンジュゲートは、現在入手可能な製剤に対する臨床的に有用な代替品を提供すると期待される。

【0003】

研究目的では、Li et al., *ibid*に開示されている方法によってポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲートを作製することができる。その方法では、コンジュゲートをナトリウム塩として調製し、透析して低分子量の汚染物質および過剰の塩を除去し、次に凍結乾燥させる。しかしながら、その方法は、臨床の開発および使用に適したコンジュゲートを量産するのにそれほど適していない。特に、透析を用いて不純物を除去した場合、時間がかかるうえに最終生成物の収率が低下する。さらに、多くの医薬品は塩として調製した方がより有利な性質(たとえば、改良された溶解性、保存性、および取扱性)を有するが、このことは本発明に係るポリグルタメート-治療薬コンジュゲートにはあてはまらない。このコンジュゲートの塩形態は静電的な固体であり、自由流動性粉末ではない。それらは、自由流動性粉末の場合よりも、包装がより困難であり、ダスト汚染をより受けやすく、しかも細胞障害薬で作業場を汚染する可能性がより高い。したがって、グラム〜何百グラムの量のこれらのコンジュゲートを高収率でかつ改良された資材管理および包装が行えるように製造するために使用可能なポリグルタミン酸-

治療薬コンジュゲートの改良された製造方法が要求されている。

【0004】

発明の概要

本発明は、グラム〜キログラム量の医薬品等級のコンジュゲートを85%~98%または約85%~約98%の収率で提供可能なポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲートの改良された調製方法を提供することにより、この要求を満足する。

【0005】

1実施形態では、この方法は、

- (a)プロトン化形態のポリグルタミン酸ポリマーおよびそれとコンジュゲート化させる治療薬を提供すること、
 - (b)不活性有機溶媒中で該治療薬を該ポリグルタミン酸ポリマーに共有結合させてポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲートを形成すること、
 - (c)過剰容量の塩水溶液を添加することにより該ポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲートを溶液から沈澱させること、および
 - (d)該コンジュゲートをプロトン化固体として回収すること、
- を含む。さらに、残留する低分子量汚染物質の除去をステップ(c)とステップ(d)の間またはステップ(d)の後で行うことができる。

【0006】

現在のところ最も好ましい他の実施形態では、

- (a)ポリグルタミン酸ポリマーの塩を不活性有機溶媒中に懸濁させること、
 - (b)この懸濁液に酸無水物を添加することにより該ポリマーをプロトン化して共役塩基の可溶性塩を形成すること、
 - (c)治療薬を提供し該治療薬を該ポリグルタミン酸ポリマーに共有結合させてポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲートを形成すること、
 - (d)過剰容量の塩水溶液を添加することにより該ポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲートを溶液から沈澱させること、および
 - (e)該コンジュゲートをプロトン化固体として回収すること、
- を含んでなる方法によって、プロトン化ポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲートの *in situ* 生成を行う。

【0007】

他の実施形態では、ポリグルタミン酸-2' バクリタキセルコンジュゲートの量産方法は、

- (a) ポリ-L-グルタミン酸のナトリウム塩の水溶液を提供すること、
 - (b) 該溶液を約2~4のpHに酸性化することにより、該ポリ-L-グルタミン酸のナトリウム塩をプロトン化形態に変換してそれを溶液から沈殿させること、
 - (c) このポリ-L-グルタミン酸沈殿を回収して水で洗浄すること、
 - (d) 約2~約7重量%、好ましくは7~21重量%、最も好ましくは約7~約21重量%の含水率まで該ポリ-L-グルタミン酸を乾燥させること、
 - (e) バクリタキセルの2' -OH基とポリ-L-グルタミン酸のカルボキシ基との間で形成されるエステル結合を介してバクリタキセルをポリグルタミン酸ポリマーにコンジュゲート化させるのに十分な時間にわたり、標準的なカップリング条件下で、ポリ-L-グルタミン酸をバクリタキセルに接触させること、
 - (f) この反応混合物に塩水溶液を徐々に添加しながら、この反応混合物を0℃~10℃または約0℃~10℃に冷却すること、
 - (h) 得られた懸濁液を酸性化すること、
 - (i) プロトン化固体としてコンジュゲートを回収すること、および
 - (j) 該プロトン化固体から不純物を抽出すること、
- を含む。

【0008】

ポリグルタミン酸-2' バクリタキセルコンジュゲートを量産するには、上記のステップ(a)~(d)の代わりに以下のステップ(a')および(b'):

- (a') 不活性有機溶媒中のポリ-L-グルタミン酸ナトリウム塩またはリチウム、カリウム、または第四級アンモニウムのポリ-L-グルタミン酸塩の懸濁液を提供すること、および
- (b') 約0.95当量のトリフルオロ酢酸またはメタンスルホン酸を添加することによりポリ-L-グルタミン酸トリフルオロアセテートまたはポリグルタミン酸メタンスルホネートのナトリウム、リチウム、カリウムまたは第四級アンモニウム塩を含む溶液を形成すること、

を行い、そして上記のステップ(e)~(j)を行うのが最も好ましい。

[0009]

本明細書に記載されている方法により、任意のポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲートを調製することができる。好ましい実施形態では、治療薬は抗腫瘍薬であり、例えば、パクリタキセル；ドセタキセル；エトポシド；テニポシド；エポチロンA、エポチロンB、エポチロンC、エポチロン、エポチロンFおよび12,13-ジスオキシエポチロンFのようなエポチロン；ゲムシタビン；20(S)(+)カンプトテシン；9-アミノカンプトテシン；9-ニトロカンプトテシン；7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン；9-ジメチルアミノメチル-10-ヒドロキシカンプトテシン；10,11-メチレンジオキシカンプトテシン；7-メチルビベリジノメチル-10,11-エチレンジオキシカンプトテシン；フラボピリドール (flavopiridol)；ゲルダナマイシン；17-(アリアルミノ)-17-デメトキシゲルダナマイシン；エクテインアシジン743 (ecteinascidin 743)；フタラシジン (phthalascidin)；CT-2584 (1-(11-(ドデシルアミノ)-10-ヒドロキシウンデシル)-3,7-ジメチルキサンチン；CT-4582 (1-(11-(N-メチルN-ドデシルアミノ)-10-ヒドロキシウンデシル)-3,7-ジメチルキサンチン)；ドキソルビシン；アドリアマイシノン；メルファラン；フルダラビン；ダウノマイシン；ベラパミル；5-フルオロウラシル；フロクスウリジン (FUDR)；シクロスポリン；レチノイン酸；7-(ジメチル-tert-ブチルシリルオキシ)-10-ヒドロキシカンプトテシンなどが挙げられる。

[0010]

詳細な説明

定義

本明細書中で使用する場合、「ポリグルタミン酸」または「ポリグルタミン酸ポリマー」は、ポリ(1-グルタミン酸)、ポリ(d-グルタミン酸)およびポリ(dl-グルタミン酸)を包含する。好ましくは、ポリグルタミン酸ポリマーは、そのアミノ酸残基の少なくとも50%、より好ましくは100%をグルタミン酸として含有する。治療薬にコンジュゲート化させたときに置換ポリグルタミン酸ポリマーが非コンジュゲート化治療薬と比較して改良された水溶性および/または改良された効能を有しかつ好ましくは非免疫原性であるかぎり、天然に存在するか、または化

学的に改変されたアミノ酸によって、好ましくは親水性アミノ酸によって、ポリグルタミン酸ポリマーを50%まで置換することができる。

【0011】

本明細書に記載の方法によるコンジュゲートの調製に使用されるポリグルタミン酸ポリマーの分子量は、典型的には5000ダルトンを超え、好ましくは15kd~80kd、より好ましくは20kd~80kd、さらに好ましくは20kd~60kd、最も好ましくは30kd~60kdである(粘度により決定した場合)。分子量の下限では、本発明のポリグルタミン酸ポリマーは、約10,000、約11,000、約12,000、約13,000、約14,000、約15,000、約16,000、約17,000、約18,000、約19,000、約20,000、約21,000、約22,000、約23,000、約24,000、約25,000、約26,000、約27,000、約28,000、約29,000、最大約30,000ダルトンの分子量を有する。上限では、本発明のポリグルタミン酸ポリマーは、約31,000、約32,000、約33,000、約34,000、約35,000、約36,000、約37,000、約38,000、約39,000、約40,000、約41,000、約42,000、約43,000、約44,000、約45,000、約46,000、約47,000、約48,000、約49,000、約50,000、約51,000、約52,000、約53,000、約54,000、約55,000、約56,000、約57,000、約58,000、約59,000、約60,000、約61,000、約62,000、約63,000、約64,000、約65,000、約66,000、約67,000、約68,000、約69,000、約70,000、約71,000、約72,000、約73,000、約74,000、約75,000、約76,000、約77,000、約78,000、約79,000、最大約80,000ダルトンの分子量を有する。当業者であれば、他の方法によって測定した場合に分子量の値が異なる可能性があることは分かるであろう。これらの他の方法としては、たとえば、ゲル浸透法、小角光散乱法、多角レーザー光散乱法、屈折率法およびそれらの組み合わせが挙げられる。

【0012】

本明細書中使用する場合、「ポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲート」とは、ポリグルタミン酸のカルボン酸残基と治療薬の官能基との直接的結合によって、または1つ以上の二官能性リンカーを介する間接的結合によって、治療薬に共有結合されているポリグルタミン酸ポリマーを意味する。好ましいリンカーは、循環時に加水分解に対して比較的安定で、生分解性で、コンジュゲートから切り離されたときに無毒である物質である。もちろん、好適なリンカーはコンジュ

ゲートの抗腫瘍効能を妨害しないと考えられる。例示的なリンカーとしては、アミノ酸(たとえば、グリシン、アラニン、ロイシン、イソロイシン)、ヒドロキシ酸(たとえば、 γ -ヒドロキシ酪酸)、ジオール、アミノチオール、ヒドロキシチオール、アミノアルコールおよびこれらの組み合わせが挙げられる。生理学的に開裂可能な結合(つまり、生きている動物体の状態に関係する酵素的または非酵素的機構により開裂可能な結合)を生成する任意の結合方法によって治療薬をポリマーまたはリンカーに結合させることができる。好ましい結合としては、たとえば、エステル、アミド、カルバメート、カーボネート、アシルオキシアルキルエーテル、アシルオキシアルキルチオエーテル、アシルオキシアルキルエステル、アシルオキシアルキルアミド、アシルオキシアルコキシカルボニル、アシルオキシアルキルアミン、アシルオキシアルキルアミド、アシルオキシアルキルカルバメート、アシルオキシアルキルスルホンアミド、ケタール、アセタール、ジスルフィド、チオエステル、N-アシルアミド、アルコキシカルボニルオキシアルキル、ウレア、およびN-スルホニルイミデートが挙げられる。

【0013】

これらの結合を形成する方法は、有機合成化学の当業者には周知であり、たとえば、J. March, *Advanced Organic Chemistry*, Wiley Interscience, 4th Editionのような標準的書籍に見いだすことができる。

【0014】

ポリマーへの生体活性薬、治療薬または診断薬の充填度(すなわち、「充填密度」)は、ポリグルタミン酸ポリマー鎖あたりの分子の数もしくは平均分子数として、または好ましくはコンジュゲートの全重量に対するパーセント(%) (「充填%」)として表現できる。所望の充填%は、治療薬とポリマーとの比を調節して所望により他の試薬を最適化することによって得られる。所与のコンジュゲートおよび所与の用途に最適な充填密度は、コンジュゲートの所望の性質(たとえば、水溶性、治療効能、薬物動態学的性質、毒性および必要用量)に基づいて経験的に決定される。充填密度は、特に本明細書に記載のコンジュゲートの場合、1%~約60%または約1%~約60%、好ましくは5%~55%または約5%~約55%、より好ましくは10%~45%または約10%~約45%の範囲である。

【0015】

充填%は、典型的には、4つの方法、すなわち、(1)計算重量%法、(2)分光測光法、好ましくはUV分光測光法、(3)NMR対比法、および(4)加水分解法によって決定される。

【0016】

(1)計算重量%法は、ポリグルタミン酸出発物質の既知重量および治療薬の重量に基づいている。いずれのコンジュゲートについても、シリカ上のTLCにより決定した場合、コンジュゲート形態への変換は100%完了している。

【0017】

(2)分光測光法、好ましくはUV分光測光法は、バクリタキセル-ポリグルタミン酸コンジュゲートで例示されるように、適切な波長における吸光度(たとえば、UV吸光度)または蛍光によって測定される治療薬の重量%に基づいている。コンジュゲートを脱イオン水(2.5または5mg/mL)に溶解し、粒状物質が存在する場合にはそれを除去するため500gで15分間遠心分離し、そして透明溶液を脱イオン水で100倍~200倍に希釈する。希釈剤を基準にして指定の波長で吸光度を読み取る。たとえば、希釈剤を基準にして228nmまたは260nmでUV吸光度を読み取る。コンジュゲートを調製するために使用した同一ロットのポリグルタミン酸の溶液をコンジュゲートと同一の公称濃度で溶解し、希釈剤を基準にして、たとえば、228nmまたは260nmでその吸光度を読み取る。メタノールに溶解させた既知濃度のバクリタキセル溶液の吸光度を、たとえば、228nmまたは260nmで測定することにより、直線的検量線を作成する。充填パーセントを計算するために、ポリグルタミン酸溶液の吸光度(ポリグルタミン酸-バクリタキセル溶液中のポリグルタミン酸の理論的充填量に相当する補正を加える)をポリグルタミン酸-バクリタキセルの吸光度から差し引く。この補正された吸光度をバクリタキセルの標準曲線と比較して、コンジュゲート溶液中のバクリタキセル濃度(w/v)を取得する。充填パーセントは、バクリタキセル濃度のポリグルタミン酸-バクリタキセルコンジュゲート濃度に対する比の100倍である。

【0018】

(3)NMR対比法は、治療薬由来のピークに対するポリマー由来のスペクトルピー

クの比により測定した場合の治療薬の重量%に基づいている。これについては、以下でポリグルタミン酸-バクリタキセルコンジュゲートを例にとりて説明する。

【0019】

約4.5ppm～約6.5ppm、好ましくは4.5ppm～6.5ppmにおける面積を合計し、プロトンの数(7)で割る。次に、この値を、ポリマー主鎖についての約3.8ppm～約4.4ppm、好ましくは3.8ppm～4.4ppmの面積と比較し、オーバーラップするバクリタキセル由来の2個のプロトンについての補正を行う。バクリタキセルとポリマーの分子量を考慮に入れて、プロトン1個あたりの2つの面積を比較する。

【0020】

A=ポリマーのプロトン1個あたりの面積÷バクリタキセルのプロトン1個あたりの面積=21.36/1.98=10.79。

【0021】

バクリタキセルのMW=837；ポリグルタミン酸モノマーのMWは129である。

【0022】

充填%=(837/(10.79×129)+837)×100=37.6%。

【0023】

本明細書に記載の方法は、一般的には、本明細書に記載されているように、ポリグルタミン酸に結合させるべく適切に官能化された任意の生体活性薬、治療薬または診断薬とポリグルタミン酸とのコンジュゲートを調製するのに有用である。本明細書に例示されているコンジュゲートは、本発明を具体的に説明することを意図したものであって、その範囲を限定するものではない。

【0024】

好ましい¹実施形態では、治療薬は、コンジュゲートの特有な薬物動態学的性質(たとえば、腫瘍組織における増強された透過性および保持性、活性物質の持続性放出、非コンジュゲート薬と比較して長い生物学的半減期など)が功を奏すると予想される癌状態の治療に有効な薬物を含む。現在のところ好ましい治療薬としては、たとえば、タキサン(バクリタキセル、ドセタキセルなど)；エトポシド；テニポシド；エポチロンA、エポチロンB、エポチロンC、エポチロンD、エポ

チロンFおよび12,13-ジスオキシエボチロンFのようなエボチロン；ゲムシタピン；20(S)(+)カンプトテシン；9-アミノカンプトテシン；9-ニトロカンプトテシン；7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン；9-ジメチルアミノメチル-10-ヒドロキシカンプトテシン；10,11-メチレンジオキシカンプトテシン；7-メチルピベリジノメチル-10,11-エチレンジオキシカンプトテシン；フラボピリドール；ゲルダナマイシン；17-(アリアルミノ)-17-デメトキシゲルダナマイシン；エクテイナシジン743；フタラシジン；CT-2584(1-(11-(ドデシルアミノ)-10-ヒドロキシウンデシル)-3,7-ジメチルキサンチン；CT-4582(1-(11-(N-メチルN-ドデシルアミノ)-10-ヒドロキシウンデシル)-3,7-ジメチルキサンチン)；ドキシソルビシン；アドリアマイシノン；メルファラン；フルグラビン；ダウノマイシン；ペラバミル；5-フルオロウラシル；フロクスウリジン(FUDR)；シクロスポリン；レチノイン酸；7-ジメチル-tert-ブチルシリルオキシ)-10-ヒドロキシカンプトテシンなどが挙げられる。

[0025]

治療薬は、天然の分子中に既に存在する官能基、または治療薬の活性を改変することなく有機合成化学における周知の手順により導入しうる官能基を利用して、ポリマーに結合させることができればならない。本明細書に与えられている実施例では、治療薬は、非コンジュゲート形態において比較的水不溶性であり、コンジュゲート化の後で大幅に改良された溶解性を示す。しかし、水溶性薬物もまた、ポリグルタミン酸にコンジュゲート化した後で利点を示すと期待される(たとえば、非コンジュゲート治療薬と比較して作用部位での改良された薬物動態および保持性)。

[0026]

「標準のカップリング条件」下で行なわれる反応は、不活性溶媒(たとえば、DMF、DMSO、N-メチルピロリドン)中で、-20℃～150℃または約-20℃～約150℃、好ましくは0℃～70℃または約0℃～約70℃、より好ましくは5℃～30℃または約5℃～約30℃の温度で、カップリング試薬および触媒の存在下で実施される。もちろん、使用温度は、治療薬の安定性および連結基の反応性のような因子に依存することになる。好適なカップリング試薬は有機合成化学において周知であり、た

たとえば、限定されるものではないが、カルボジイミド、アルキルクロホルメートおよびトリエチルアミン、ビリジニウム塩-トリブチルアミン、フェニルジクロロホスフェート、2-クロロ-1,3,5-トリニトロベンゼンおよびビリジン、ジ-2-ビリジルカーボネート、ポリスチリルジフェニルホスフィン、(トリメチルシリル)エトキシアセチレン、1,1'-カルボニルビス(3-メチルイミダゾリウム)トリブレート、ジエチルアゾジカルボキシレートおよびトリフェニルホスフィン、N'-カルボニルジイミダゾール、メタンスルホニルクロリド、ビバロイルクロリド、ビス(2-オキソ-3-オキサゾリジニル)ホスフィン酸(「BOP-Cl」)、2-クロロメチルビリジニウムヨージド(「CMTI」)などが挙げられる。アルコールカップリングに好適な触媒としては、4-N,N-ジメチルアミノビリジンおよび4-ピロリジノビリジンなどの有機塩基が挙げられる。

【0027】

明細書中で使用する場合、「不活性溶媒」という用語は、反応に関連して記載されている反応条件下で不活性な溶媒を意味する[たとえば、ベンゼン、トルエン、アセトニトリル、テトラヒドロフラン(「THF」)、ジメチルホルムアミド(「DMF」)、クロロホルム(「CHCl₃」)、塩化メチレン(すなわち、ジクロロメタンまたは「CH₂Cl₂」)、ジエチルエーテル、酢酸エチル、アセトン、メチルエチルケトン、ジオキサン、ビリジン、ジメトキシエタン、*n*-ブチルメチルエーテルなどが挙げられる]。相反する記載がないかぎり、本発明の反応に使用される溶媒は不活性溶媒である。

【0028】

多数の官能基が治療薬上に存在する場合、治療薬の特定の基をポリグルタミン酸ポリマーに選択的に結合させるには、好適な保護基を使用する必要がある。「保護基」または「ブロック基」という用語は、化合物中の1個以上のヒドロキシル、チオール、アミノまたはカルボキシル基に結合させた場合、これらの基で反応が起こるのを防止し、そして、従来の化学的または酵素的ステップによりその保護基が除去され、ヒドロキシル、チオール、アミノまたはカルボキシル基を再生することのできるような任意の基を意味する。一般的には、T.W. Greene & P. G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis," 3rd Ed, 1999, Joh

n Wiley and Sons, N.Y.を参照されたい。

【0029】

利用される特定の除去可能なブロック基は決定的なものではなく、好ましい除去可能なヒドロキシルブロック基としては、アリル、ベンジル、アセチル、クロロアセチル、チオベンジル、ベンジリジン、フェナシル、*t*-ブチル-ジフェニルシリル、*t*-ブチルジメチルシリル、トリエチルシリル、MOM(メトキシメチル)、MBM(2-メトキシエトキシメチル)、*t*-BOC(*tert*-ブチルオキシカルボニル)、CBZ(ベンジルオキシカルボニル)のような従来の置換基、ならびにヒドロキシル官能基上に化学的に導入することができ、その後、生成物の性質に適合した温和な条件で化学的または酵素的方法のいずれかにより選択的に除去することのできる任意の他の基が挙げられる。

【0030】

好ましい除去可能なアミノブロック基としては、生成物の性質に適合した従来の条件で除去することのできる***t*-ブチルオキシカルボニル(*t*-BOC)**、ベンジルオキシカルボニル(**CBZ**)、フルオレニルメトキシカルボニル(**Fmoc**)、アリルオキシカルボニル(**ALOC**)などのような従来の置換基が挙げられる。

【0031】

他の実施形態では、ピログルタミン酸のようなピロ誘導体化アミノブロック基を使用することができる。特定の実施形態では、ピログルタミン酸を除去してもなくてもよい。

【0032】

好ましいカルボキシル保護基としては、生成物の性質に適合した温和な加水分解条件で除去することのできるエステル、好ましくは、メチル、エチル、プロピル、*t*-ブチルなどのようなアルキル基を含有するエステルが挙げられる。

【0033】

命名法

本明細書に記載されている本発明の実施形態に従って調製された例示的なコンジュゲートを図1に示す。以下の実施例に記載のコンジュゲートについても、図1のコンジュゲートの場合と同様にして命名することができる。

【0034】

好ましい実施形態の説明

一般的には、臨床の開発および製薬の使用に好適な規模でポリグルタメート-治療薬コンジュゲートを製造する方法は、

(a)プロトン化形態のポリグルタミン酸ポリマーおよびそれとコンジュゲート化させる治療薬を提供すること、

(b)不活性有機溶媒中で該治療薬を該ポリグルタミン酸ポリマーに共有結合させてポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲートを形成すること、

(c)過剰容量の塩水溶液を添加することにより該ポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲートを溶液から沈澱させること、および

(d)該コンジュゲートをプロトン化固体として回収すること、を含む。

【0035】

ステップ(a)のプロトン化形態のポリグルタミン酸ポリマーは、出発物質として使用されるポリグルタミン酸の塩を含有する溶液を酸性化して塩をその酸形態に変換することにより得られる。遠心分離により固体を分離した後、固体を水で洗浄する。(ジメチルアミノピリジン〔DMAP〕)をステップ(b)で使用する場合、水相がpH3以上になるまで固体を洗浄することが好ましい)。その後、ポリグルタミン酸を、好ましくは凍結乾燥法によって、好ましくは、所望の治療薬にコンジュゲート化(ステップ(b))する前に、約2%~約21%の水、好ましくは約7%~約21%の水、より好ましくは7%~21%の水を含む恒量になるまで乾燥させる。

【0036】

ステップ(b)の治療薬は、コンジュゲート化を行う前に、例えば、新しい官能基の導入、既存の官能基の修飾またはスパーサー分子の結合などの改変を行うことが必要な場合もある。そのような改変を行う際、先に記載の保護基の使用が必要になることもある。

【0037】

反応スキームI~IIIは、種々の例示的な治療薬を、直接またはグリシンスパーサー分子を介してポリ-L-グルタミン酸(PG)に結合するために使用した方法を示

している。これらのスキームで示された実施例に記載の条件は変更可能であり、有機合成化学の当業者であればこのことは容易に分かるであろう。ポリグルタミン酸に特定の治療薬をコンジュゲート化するために使用される正確な条件は、反応条件に対する治療薬の安定性、結合基の反応性、製造プロセスに関連する他の因子(たとえば、安全性および規制事項)などに基づく可能性がある。先に述べたように、リンカーを使用する場合、コンジュゲートの調製時には、治療薬およびリンカー分子の利用可能な官能基に応じて種々のタイプの結合を利用することが可能である。この場合、治療薬は、エステル結合およびアミド結合以外の結合によりポリグルタミン酸および/またはリンカー分子にコンジュゲート化させることが可能である。グリシン以外のリンカーおよび本明細書に例示されたもの以外のカップリング試薬を使用することもできる。本発明の実施形態の実施を説明する、コンジュゲート調製に使用される正確な条件について、以下の実施例で説明する。

【0038】

ステップ(c)において、ポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲートを溶液から沈殿させるために、塩水溶液を反応混合物に添加する。この目的のために、ナトリウム、カリウムおよびアンモニウムの塩、ならびにハロゲン化物および硫酸の塩などの任意の水溶性無機塩を使用することができる(たとえば、NaCl、KCl、 NH_4Cl 、硫酸ナトリウム、硫酸アンモニウムなど)。好ましくは、10~15%の塩溶液を1~4倍容量で使用する。好ましい実施形態では、10%のNaClを2.5倍容量で使用する。塩溶液を反応混合物に徐々に添加し、添加中、反応混合物を冷却する。最適収率でコンジュゲートが得られるように、約 0°C ~約 10°C 、好ましくは 0°C ~ 10°C に温度を保持する。沈殿ステップでは、コンジュゲートを沈殿させるのに使用される条件下で全部または部分的に溶解する出発物質および反応副産物からポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲートを分離する。

【0039】

ステップ(d)において、コンジュゲートをプロトン化固体として回収する。好ましくは、ステップ(c)で得られた懸濁液を酸性化する。酸性条件に対する薬物分子の安定性に応じて、約pH1~約pH4、好ましくはpH1~4の範囲のpHを使用する。

ことができる。しかしながら、ポリグルタミン酸-バクリタキセルコンジュゲートを調製する場合、pH2未満に酸性化するとバクリタキセルが分解を起こすので、典型的には約pH2.5で酸性化を行う。好ましくは、DMAPのような塩基を除去するために塩酸(HCl)のような酸をステップ(d)で使用する。懸濁液を濾過または遠心分離することにより、好ましくは濾過することにより、コンジュゲートを回収することができる。

【0040】

酸性化の前または後で、未反応の出発物質、副産物および他の不純物を除去して最終のプロトン化コンジュゲートを得ることができる(以下の実施例2および3ならびに図2および4に示されている)。たとえば、塩溶液の添加後、固体を回収して再溶解させ、次に、濾過するか、または汚染物質は溶解するがコンジュゲートは溶解しない適切な溶媒(たとえば、酢酸エチル、塩化メチレン、クロロホルム、ヘキサン、ヘプタン、ジエチルエーテルおよびジオキサン)で抽出することができる。その後、上述したように、溶液を酸性化してプロトン化形態のコンジュゲートを回収する。

【0041】

あるいは、固体を凍結乾燥し、次に、例えば、アセトニトリル(MeCN); ジエチルエーテル、ジオキサン、テトラヒドロフランのようなエーテル; クロロホルム、塩化メチレンのようなハロゲン化溶媒; アセトンおよびメチルエチルケトン(MEK)のようなケトン; tert-ブチルアルコール、イソプロピルアルコール、エチルアルコールまたはメタノールのようなC1~C10アルコール; などの適切な溶媒またはそれらの混合物でスラリー化することにより、最終のプロトン化コンジュゲート生成物から不純物を除去することができる。

【0042】

このほかの好ましい実施形態では、上記のステップ(c)の代わりに以下のステップ(c')を使用する。ステップ(c')には、

(c') 未反応の出発物質および副産物を溶解しうる有機溶媒の添加により、未反応の出発物質および副産物から前記ポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲートを分離して前記ポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲートを溶液から沈殿させる

こと、
が含まれる。

【0043】

酢酸エチルおよびアセトニトリルのほかに、コンジュゲートを精製するために使用することのできる他の溶媒として、たとえば、クロロホルム、テトラヒドロフラン、ジオキサン、トルエン、2-ブチルメチルエーテルなどが挙げられる。

【0044】

現在のところ、プロトン化ポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲートの *in situ* 生成を行う代替の手順が最も好ましい。この方法には、

- (a) ポリグルタミン酸ポリマーの塩を不活性有機溶媒中に懸濁させること、
 - (b) この懸濁液に酸無水物を添加することにより該ポリマーをプロトン化して共役塩基の可溶性塩を形成すること、
 - (c) 治療薬を提供し該治療薬を該ポリグルタミン酸ポリマーに共有結合させてポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲートを形成すること、
 - (d) 過剰容量の塩水溶液を添加することにより該ポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲートを溶液から沈澱させること、および
 - (e) 該コンジュゲートをプロトン化固体として回収すること、
- が含まれる。

【0045】

この *in situ* 手順を用いると、プロトン化PGポリマーの調製時における多くのステップが省略され、全プロセス時間が最大で1週間削減される。さらに、生成物は、*in situ* 手順で製造したときの方が本明細書に開示されている他の方法を用いたときよりも迅速に水溶液に溶解すると考えられる。

【0046】

この手順では、共役塩基の塩が、この手順に使用すべく選択された有機溶媒に可溶であるかぎり、上記のステップ(b)で任意の酸無水物を使用することが可能である。好適な酸としては、たとえば、トリフルオロ酢酸、クロロ酢酸、ブromo安息香酸、クロロ安息香酸、クロロフェノキシ酢酸、クロロフェニル酢酸、シアノ酢酸、シアノ酪酸、シアノフェノキシ酢酸、シアノプロピオン酸、ジクロロ酢

酸、アセト酢酸、フマル酸、馬尿酸、ヨード酢酸、乳酸、マロン酸、メサコン酸、ナフトエ酸、ニトロ安息香酸、フタル酸、メタンスルホン酸、HBr、HClおよびHIが挙げられる。

【0047】

ステップ(c)、(d)および(e)は、一般の手順に関する先の記載に従って行われる。

【0048】

表1は、以下の実施例3の記載に従って調製されたポリ-L-グルタミン酸-バクリタキセルコンジュゲートの代表的な分析結果を示している。表2は、以下の実施例7の記載に従ってin situで調製されたポリ-L-グルタミン酸-バクリタキセルコンジュゲートの代表的な分析結果を示している。

【0049】

【表1】

表1・分析データ

収率 ^a	全生成量 ^b (g)	充填 ^c (UV)	充填 ^c (NMR)	遊離バクリタキセル ^d	残留MeCN ^e	残留DMF ^f	DIPU ^g	ROI ^h
93.6	87.80	42.0	34.0	0.128	0.15	0.27	0.160	0.87

^a 収率%；^b コンジュゲート(g)；^c UV法によって決定したバクリタキセル(g)/コンジュゲート(g)；^d NMR法によって決定したバクリタキセル(g)/コンジュゲート(g)；^e コンジュゲートに対する遊離バクリタキセルの重量%；^f コンジュゲートに対するアセトニトリル残留物の重量%；^g コンジュゲートに対するジメチルホルムアミド残留物の重量%；^h コンジュゲートに対するジイソプロピル尿素の重量%；ⁱ イグニッションに関する残基の重量%。

【0050】

【表2】

表2・分析データ

質量% ^a	全生成量 ^b (g)	充填% (NMR) ^d	残留 MeCN% ^e	残留 DMF% ^f	DIPU% ^g
95.1	0.485	36.0	0~0.01	0.01~0.45	0

^a 収率% ; ^b コンジュゲート(g) ; ^d NMR法によって決定したバクリタキセル(g)/
コンジュゲート(g) ; ^e コンジュゲートに対するアセトニトリル残留物の重量%
; ^f コンジュゲートに対するジメチルホルムアミド残留物の重量% ; ^g コンジュ
ゲートに対するジイソプロピル尿素の重量%。

【0051】

本発明を以下の実施例によって説明するが、本実施例をいかなる場合において
も本発明の範囲を限定するものとみなすべきではない。

【0052】

実施例

以下の実施例において、コンジュゲートの製造における中間体は¹H NMRによっ
て特性付けた。以下に例示するコンジュゲートの調製に使用したポリグルタミン
酸(Na塩)の分子量は、供給元(Sigma Chemical Co., Milwaukee, WI)が粘度測定
に基づいて特定するところによれば、20kd~50kdの範囲であった。コンジュゲー
トの平均充填密度は37%であった。

【0053】

実施例1・ポリ-L-グルタミン酸の調製

ポリ-L-グルタミン酸ナトリウム塩(85.9g)(Sigma Chemical Co., 37kd分子量(粘
度測定によって決定))を、USP精製水(534mL; 6.2mL/g)に溶解し、溶液を0℃~
5℃に冷却した。希塩酸溶液(1M)を強く攪拌し、温度を<10℃に維持しながら、pH
がpH2~2.5になるまで滴下した。添加中にポリ-L-グルタミン酸が溶液から分離
した。反応混合物を室温まで加温し、1時間攪拌した。懸濁液を2700 × gで10分
間遠心分離した。上部の水層を除去し、固体をUSP精製水560mLに再懸濁し、10分
間再度遠心分離した。上部の水層を除去し、pHを測定した。必要であれば、水層
のpHが>3.0となるまで洗浄を続けた。湿性固体を、恒量になるまでLABCONCO(登
録商標)凍結乾燥装置において凍結乾燥した。ナトリウムの重量%は、ICPによっ
て決定したところ7000ppm以下であった。

【0054】

実施例2・ポリ-L-グルタミン酸-2'-バクリタキセルコンジュゲートの調製

上記実施例1に記載したように調製したポリ-L-グルタミン酸(16.82g)を、無水N,N-ジメチルホルムアミド(180mL)、バクリタキセル(9.923g、11.6mmol)およびN,N-ジメチルアミノピリジン(283mg、2.32mmol)に懸濁した。反応混合物を、30分間攪拌した。N,N-ジイソプロピルカルボジイミド(1.903g、15.08mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(50mL)溶液を、シリンジポンプを用いて3時間かけて添加した。添加後、反応が完了するまで攪拌した(室温で約4時間)。反応物を、5℃～10℃に冷却し、10%の塩化ナトリウム溶液(345mL)をゆっくりと添加し、ポリ-L-グルタミン酸-バクリタキセルコンジュゲートを沈殿させた。混合物を遠心分離用フラスコに移しそれを1500gで遠心分離することによってこの沈殿物を分離した。湿性固体を水(150mL)に再懸濁し、力強く攪拌しながら1M炭酸水素ナトリウム溶液(120mL)をゆっくりと添加して、溶液のpHをpH7にした。反応物を1時間攪拌し、0.2ミクロンのフィルターを通して濾過することで不純物を除去した。濾液を0℃～5℃に冷却し、溶液のpHがpH3になるまで力強く攪拌しながらHCl(1N)をゆっくりと添加した。攪拌を30分間続けた。沈殿した固体を1500gで遠心分離し、湿性固体を水(150mL)に懸濁し遠心分離することを2回行うことで洗浄した。生成物を凍結乾燥することで、ポリ-L-グルタミン酸-バクリタキセルコンジュゲート24g(収率90%)を得た。

【0055】

上記の方法において濾過ステップは、酢酸エチル(250mL、2x)で溶液を洗浄し不純物を除去することによって省くことができる。

【0056】

上記と同様の方法で調製したが、バクリタキセルをより多く充填する(すなわち55%)ポリ-L-グルタミン酸-2'-バクリタキセルコンジュゲートについての典型的なプロトンNMR走査を図3に示す。

【0057】

実施例3・ポリ-L-グルタミン酸-2'-バクリタキセルコンジュゲートの調製(製造方法)

上記実施例1に記載したように調製したポリ-L-グルタミン酸(42g)を、機械的攪拌器、添加用漏斗および温度計を備えた3L容の三口丸底フラスコに添加した。N,N-ジメチルホルムアミド(350mL)を添加し、10分間攪拌した。さらにバクリタキセル(24.66g)およびN,N-ジメチルアミノピリジン(0.70g)を添加し、10分間攪拌した。N,N-ジイソプロピルカルボジイミド(4.73g)のN,N-ジメチルホルムアミド(143mL)溶液を、添加用漏斗を用いて1時間かけて室温にて添加し、4時間攪拌した。反応混合物を5℃～10℃に冷却し、冷却した10%の塩化ナトリウム溶液(1.2L)を添加用漏斗を用いて滴下し、水-塩混合物中でフラスコを冷却することで5℃～10℃に温度を維持した。塩化ナトリウム溶液の添加後、1N塩酸溶液(35mL)を反応物のpHが2.5に達するまで滴下添加した。反応混合物を5℃～10℃で30分間攪拌し、沈殿したポリ-L-グルタミン酸-バクリタキセルコンジュゲートを濾過によって回収した。固体を水で3回洗浄し、凍結乾燥器において24時間凍結乾燥した。乾燥固体を乳鉢と乳棒を用いて微細な粉末にした。微細な粉末にしたポリ-L-グルタミン酸-バクリタキセルコンジュゲートをアセトニトリル(1000mL)に懸濁し、2時間攪拌した後に濾過し、固体をアセトニトリル200mLで2回洗浄した。固体を真空下で24時間乾燥させることでポリ-L-グルタミン酸-バクリタキセルコンジュゲート(60g)を得た(収率90%)。

[0058]

実施例4・ポリ-L-グルタミン酸-グリシン-バクリタキセルコンジュゲートの調製(反応スキームII)

以下のステップ1および2は、実質的にはMathewら(Mathew, AE., Mejillano, M.R, Nath, J.P., Himes, R.H.,およびStella, V.J., J. Med. Chem., 35: 145-151, 1992)に記載のように行った。

[0059]

ステップ1・2'-(N-t-BOC-グリル)バクリタキセルの調製

N-t-BOC-L-グリシン(131mg, 0.75mmol)およびバクリタキセル(640mg, 0.75mmol)のジクロロメタン(20mL)溶液に、1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(124mg, 0.98mmol)、続いてN,N-ジメチルアミノピリジン(27mg, 0.23mmol)を添加した。室温で4時間攪拌した後に、混合物を減圧下で濃縮した。残留物を、酢酸エチル/

ヘキサン(1:1(v/v))で溶出するシリカゲルフラッシュクロマトグラフィーによって精製することで、2'-(N-t-BOC-グリシル)バクリタキセル(720mg、収率95%)を白色粉末として得た。

【0060】

ステップ2. 2'-(グリシル)バクリタキセルの調製

2'-(N-t-BOC-グリシル)バクリタキセル(245mg、0.242mmol)のギ酸(2mL)溶液を30分間攪拌した。減圧下で濃縮後、残留物を水(15mL)に懸濁した。冷却した0.05M炭酸水素ナトリウム溶液(45mL)を添加し、溶液(pH 8.0)をジクロロメタン(2 × 40mL)で抽出した。合わせたジクロロメタン抽出物を、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下で濃縮した。残留物を4%メタノール/ジクロロメタンで溶出するシリカゲルフラッシュクロマトグラフィーによって精製することで、2'-(グリシル)バクリタキセル(161mg、収率73%)を白色粉末として得た。

【0061】

ステップ3. ボリ-L-グルタミン酸-2'-(グリシル)バクリタキセルコンジュゲートの調製

ボリ-L-グルタミン酸(275mg、1.87mmol)の無水ジメチルホルムアミド(6mL)懸濁液を攪拌しながら、これに2'-(グリシル)バクリタキセル(161mg、0.177mmol)を添加した。1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(29mg、0.23mmol)のジメチルホルムアミド(1.4mL)溶液を、懸濁液に攪拌しながら30分間かけて添加した。室温で3時間攪拌した後、混合物を氷浴中で冷却し氷浴の温度を0℃～5℃にし、次いで10%の塩化ナトリウム水溶液(7mL)を30分間かけて添加することでボリ-L-グルタミン酸-2'-(グリシル)バクリタキセルコンジュゲートを沈殿させた。得られた白色懸濁液を1500gで15分間遠心分離した。濾過後、固体を水(10mL)に懸濁させ、遠心分離にかけることによって2回洗浄した。粗生成物を水(6mL)に懸濁し、1M炭酸水素ナトリウム水溶液(2.3mL)を攪拌しながらゆっくりと添加することでフラスコの内容物をpH7.6にした。さらに2時間攪拌した後、水層を酢酸エチル(3 × 6mL)で洗浄し、次いで1N塩酸を添加することで酸性化しpH2.8にした。沈殿した固体を遠心分離によって分離し、水(2 × 6mL)で洗浄した。湿性固体を凍結乾燥することで、ボリ-L-グルタミン酸-2'-(グリシル)バクリタキセルコンジュ

ゲート(315mg、収率72%)を白色粉末として得た。

【0062】

同様の方法を用いて、上記のコンジュゲートをグリシン以外のアミノ酸で置換した。

【0063】

実施例5・ポリ-L-グルタミン酸-2'-ドセタキセルコンジュゲートの調製(反応スキームIII)

ステップ1・10-デアセチルバクリタキセルの調製

10-デアセチルバクリタキセルは、実質的にはZheng, Q.Y., Darbie, L.G., Chen, X., Murray, C.K., Tetrahedron Letters., 36: 2001-2004, 1995および米国特許第5,629,433号に記載のように調製された。

【0064】

バクリタキセル(1.0g、1.17mmol)のテトラヒドロフラン(20mL)溶液に、過酸化水素(30%、20mL)、続いて炭酸水素ナトリウム(1.92g、22.85mmol)を添加した。室温で18時間攪拌した後に、混合物をジクロロメタン/水(1:1(v/v)、100mL)で処理した。有機層を水(2 × 30mL)で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、真空中で濃縮した。残留物を3%メタノール/ジクロロメタン(v/v)で溶出するシリカゲルフラッシュクロマトグラフィーによって精製することで、10-デアセチルバクリタキセル(890mg、収率93%)を白色粉末として得た。

【0065】

ステップ2・2',7-ビス(トリエチルシリル)-10-デアセチルバクリタキセルの調製

2',7-ビス(トリエチルシリル)-10-デアセチルバクリタキセルを、米国特許第5,629,433号に記載のように調製した。

【0066】

10-デアセチルバクリタキセル(850mg、1.05mmol)の無水ピリジン(20mL)溶液に、クロロトリエチルシラン(2.72mL、20.1mmol)を室温でアルゴン雰囲気下において30分間かけて添加した。17時間攪拌した後に、混合物をジクロロメタン(75mL)で処理し、水(3 × 30mL)、10%の硫酸銅水溶液(4 × 35mL)、水(30mL)および塩化

ナトリウム飽和水溶液(30mL)で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ減圧下で濃縮することで、2',7-ビス(トリエチルシリル)-10-デアセチルバクリタキセル(980mg、収率90%)を粉末として得た。

【0067】

ステップ3・2',7-ビス(トリエチルシリル)-10-デアセチルバクリタキセルイミンの調製

2',7-ビス(トリエチルシリル)-10-デアセチルバクリタキセルイミンを、米国特許第5,629,433号に記載のように調製した。

【0068】

2',7-ビス(トリエチルシリル)-10-デアセチルバクリタキセル(730mg、0.70mmo1)のテトラヒドロフラン(7.3mL)溶液に、ジルコノセンクロリドヒドリド(543mg、2.11mmo1)を添加した。室温でアルゴン雰囲気下において15時間攪拌した後、混合物を冷ヘキサン(75mL)中に注いだ。沈殿したジルコニウム錯体を濾過によって除去した。濾液を減圧下で濃縮することで、2',7-ビス(トリエチルシリル)-10-デアセチルバクリタキセルイミン(636mg、収率92%)を白色粉末として得た。

【0069】

ステップ4・10-デアセチルバクリタキセル第一級アミンの調製

10-デアセチルバクリタキセル第一級アミンを、米国特許第5,629,433号に従って調製した。

【0070】

2',7-ビス(トリエチルシリル)-10-デアセチルバクリタキセルイミン(636mg、0.621mmo1)の濃塩酸/95%エタノール(1% (w/w))(25mL)溶液を15時間攪拌し、水(65mL)で処理し、ヘキサン(2 x 30mL)で洗浄した。水層を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液を添加することによって中和し(pH7)、ジクロロメタン(2 x 40mL)で抽出した。合わせた抽出物を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下で濃縮することで第一級アミン粗生成物(405mg、収率92%)を白色粉末として得た。この生成物を、さらに精製することなく次のステップに用いた。

【0071】

ステップ5・ドセタキセルの調製

ドセタキセルを、米国特許第5,629,433号に従って調製した。

【0072】

10-デアセチルバクリタキセル第一級アミン(405mg、0.57mmol)の酢酸エチル(40mL)溶液に、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(40mL)を添加した。この二層混合物に、二炭酸ジ-tert-ブチル(225mg、1.03mmol)を添加した。室温で15時間攪拌した後、酢酸エチル(75mL)を添加した。有機層を水(2 × 30mL)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、真空中で濃縮した。残留物を4%メタノール/ジクロロメタンで溶出するシリカゲルフラッシュクロマトグラフィーによって精製すること、ドセタキセル(351mg、収率76%)を白色粉末として得た。

【0073】

ステップ6・ポリ-L-グルタミン酸-2'-ドセタキセルコンジュゲートの調製

ポリ-L-グルタミン酸(658mg、4.47mmol)の無水ジメチルホルムアミド(10mL)懸濁液に、ドセタキセル(385mg、0.48mmol)およびN,N-ジメチルアミノピリジン(12mg、0.096mmol)を添加した。この懸濁液を攪拌しながら、これに1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(78.8mg、0.624mmol)のジメチルホルムアミド(3mL)溶液を、20分間かけて滴下した。15時間攪拌した後に、混合物を氷浴中で冷却し、10%の塩化ナトリウム水溶液(20mL)を30分間かけて添加した。さらに1時間攪拌した後、固体を濾過し、濾過ケーキを水(4 × 50mL)で洗浄した。固体を恒量になるまで凍結乾燥し、次いでアセトニトリル(4 × 50mL)で粉砕した。高真空中で15時間乾燥させることによって、ポリ-L-グルタミン酸-2'-ドセタキセルコンジュゲート(890mg、収率87%)を白色粉末として得た。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆): δ 12.10(s, -COOH), 7.05-8.20(m, 芳香族プロトン), 4.80-6.05(m), 3.80-4.50(m), 5.0-5.6(m, 5-H₂, 7-H₂), 3.70-4.35(m), 1.20-2.80(m), 1.00(s)。

【0074】

実施例6・ポリ-L-グルタミン酸-グリシル-20(S)カンプトテシンの調製(反応スキームI)

以下のステップ1および2は、Greenwald, R.B., Pendri, A., Conover, C.D., Lee, C., Choe, Y.H., Gilbert, C., Martinez, A., Xia, J., Wu, D.,およびHsue, M., Bioorg. & Med. Chem., 6: 551-562, 1998によって記載されたように

行った。

【0075】

ステップ1. 20-(N-t-BOC-グリシル)-20(S)カンプトテシンの調製

N-t-BOC-グリシン(530mg, 3.0mmol)の無水ジクロロメタン(240mL)溶液に、1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(379mg, 3.0mmol)、N,N-ジメチルアミノピリジン(244mg, 2mmol)および20(S)カンプトテシン(348mg, 1.0mmol)を0℃にて添加した。反応混合物を放置して室温まで加温させた。18時間攪拌した後に、混合物を0.1N塩酸水溶液(2×50mL)、水(2×50mL)、0.1M炭酸水素ナトリウム水溶液(2×25mL)および水(2×50mL)の順に用いて洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下で濃縮した。残留物をメタノール(7mL)から結晶化させることで、20-(N-t-BOC-グリシル)-20(S)カンプトテシン(424mg, 収率84%)を黄色粉末として得た。¹H NMR(300MHz, CDCl₃): δ 8.35(s, 1H), 8.22(d, J = 8.38Hz, 1H), 7.91(d, J = 8.07, 1H), 7.76-7.85(m, 1H), 7.65(t, J = 7.4Hz, 1H), 7.26(s, 1H), 5.70(d, J = 17.25Hz, 1H), 5.40(d, J = 17.25Hz, 1H), 5.25(s, 2H), 4.95(br s, 1H), 3.98-4.25(m, 2H), 2.18-2.26(m, 2H), 1.38(s, 9H), 0.95(t, J = 7.47Hz, 3H)。

【0076】

ステップ2. 20-グリシル-20(S)カンプトテシントリフルオロ酢酸塩の調製

20-(N-t-BOC-グリシル)-20(S)カンプトテシン(424mg, 0.84mmol)を含むジクロロメタン/トリフルオロ酢酸(1:1(v/v))混合物(21mL)の溶液を、室温で1時間攪拌し、溶媒を減圧下で蒸発させた。黄色固体をジクロロメタン/ジエチルエーテル(3:7(v/v), 50mL)から結晶化させることで、20-グリシル-20(S)カンプトテシントリフルオロ酢酸塩(361mg, 収率83%)を淡黄色(light yellow)粉末として得た。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆): δ 8.78(s, 1H), 8.45(br s, 2H), 8.20(d, J = 8.2Hz, 1H), 7.70-7.95(m, 2H), 7.30(s, 1H), 5.55(s, 2H), 5.30(s, 2H), 4.35(d, J = 17.9Hz, 1H), 4.15(d, J = 17.9Hz, 1H), 2.10-2.30(m, 2H), 1.00(t, J = 7.4Hz, 3H)。

【0077】

ステップ3. ボリ-L-グルタミン酸-20-グリシル-20(S)カンプトテシンコンジュ

ゲートの調製

20-グリシル-20(S)カンプトテシントリフルオロ酢酸塩(351mg、0.68mmol)、ポリ-L-グルタミン酸(465mg、3.16mmol)およびN,N-ジメチルアミノピリジン(249mg、2.04mmol)の無水ジメチルホルムアミド(13mL)懸濁液を攪拌しながら、これに1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(111.6mg、0.88mmol)のジメチルホルムアミド(2mL)溶液を20分間かけて添加した。アルゴン雰囲気下で2日間攪拌した後、混合物を氷浴中で冷却し、10%の塩化ナトリウム水溶液(35mL)を30分間かけて添加した。さらに1時間攪拌した後に、1N塩酸水溶液を添加することで懸濁液をpH2.5まで酸性化した。黄色沈殿物を濾過によって回収し、水(5×25mL)で洗浄し、真空下で一晩乾燥させ、さらにアセトニトリル(100mL)で粉砕した。高真空下で24時間乾燥させた後、ポリ-L-グルタミン酸-20-グリシル-20(S)カンプトテシンコンジュゲート(703mg、収率95%)を黄色粉末として得た。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆): δ 12.10(s, -COOH), 7.05-8.74(m, 7,9,10,11,12, &14 CH), 5.0-5.6(m, 5-CH₂, 7-CH₂), 3.70-4.35(m, -Gly-CH₂, PG-N-CH-), 1.42-2.62(m, 18-CH₂, PG-δ C H₂, δ CH₂), 0.90(br s, 19-CH₃)。 ¹H NMRにより、バクリタキセルの充填度が34%であることが示された。

【0078】

実施例7・ポリグルタミン酸-バクリタキセルのin situ生成方法

100mLの丸底フラスコに、スターラーバー、ポリ-L-グルタミン酸、ナトリウム塩(340mg、2.25mmol、11.3当量)および無水ジメチルホルムアミド7mLを入れた。懸濁液を攪拌し、トリフルオロ酢酸(156μL、2.03mmol、10.2当量)をシリンジを用いて適切に添加した。懸濁した固体を約5分間溶解した。バクリタキセル(170mg、0.199mmol、1.0当量)を固体として添加し、次いで4-(N,N-ジメチルアミノ)ピリジン(10mg、0.082mmol、0.4当量)およびジイソプロピルカルボジイミド(40μL、0.259mmol、1.3当量)を添加した。溶液を室温で18時間攪拌し、次いで氷浴を用いて0℃まで冷却した。10重量%の塩化ナトリウム水溶液を、力強く攪拌しながらゆっくりと添加することで微細な白色固体の沈殿が生じた。pHを希塩酸を用いて2.5に調整し、懸濁液を50mLの遠心分離用チューブに移した。固体を遠心し、上清をデカンテーションすることで得られた物質を水35mLに懸濁した。懸濁

液を再度遠心し、デカンテーションし、水35mLに再懸濁した。この最後のすすぎの後に、残った物質を凍結乾燥して乾燥粉末を得た。粉末をアセトニトリル15mLで3回すすぎ、次いで残った溶媒を高真空中で除去することで白色粉末485mgを得た。¹H NMR(d_6 DMSO)により、バクリタキセルの充填が38重量%であることが示された。

【0079】

実施例8・生物学的アッセイ

抗腫瘍活性を、ルイス(Lewis)肺癌細胞(LL/2)を皮下に移植したマウスにおいてアッセイした。マウスルイス肺(LL/2)癌細胞(ATTC CRL-1642)2.5 × 10⁶個を含むPBS+2% FBS 0.25ml容量を皮下注射することによって、右肩甲内部領域の筋肉に腫瘍を生じさせた。腫瘍が20±20mm³(平均230個の腫瘍)まで成長していた場合、試験化合物およびビヒクル対照を腫瘍細胞移植後7日目に腹腔内注射した。単一用量のポリグルタミン酸-治療薬コンジュゲートを含む0.1N Na₂HPO₄を非コンジュゲート治療薬の最大許容等価量の1~4倍で投与した。典型的には、8.3%クレモフォア(cremophore)EL/8.3%エタノールを含む0.75%生理食塩水中に加えて投与した。各々の処置群は、各群に無作為に配分された10匹のマウスから構成された。まず、腫瘍成長を3~4日ごとにモニターした。腫瘍サイズが任意に設定した上限2500mm³に近づいた場合には、腫瘍サイズを毎日測定した。腫瘍体積は、式(長さ×幅×高さ)/2に従って計算された。2500mm³以上の腫瘍を有するマウスは、首脱臼によって安楽死させた。種々の処置の効力を、最大許容量の非コンジュゲート治療薬と比較して、腫瘍が体積2500mm³に達するまでの日数で表した(すなわち、TGD、腫瘍成長遅延)。

【0080】

上記の実施例2、3、5および6に記載したPG-治療薬コンジュゲートをこのアッセイにおいて試験し、活性であることを見出した。

【0081】

実施例9・ポリ-L-グルタミン酸-CT2584の調製

ポリ-L-グルタミン酸(4.95g)を無水N,N-ジメチルホルムアミド(120mL)に懸濁し、CT2584(0.873g, 1.634mmol)を添加した。透明溶液が形成されるまで、反応

混合物を攪拌しながら50℃まで加温した。反応混合物を室温まで冷却し、N,N-ジイソプロピルカルボジミド(0.247g、1.96mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(5 mL)溶液を、滴下漏斗を用いて30分間かけて添加した。滴下後、反応物を室温で4時間攪拌した。反応物を5℃~10℃に冷却し、10%の塩化ナトリウム溶液(200mL)をゆっくりと添加してポリ-L-グルタミン酸CT2584コンジュゲートを沈殿させた。沈殿物を1500×gで遠心分離することによって回収した。湿性固体を、水(150 mL)に懸濁し遠心分離することによって2回洗浄した。生成物を凍結乾燥することで、ポリ-L-グルタミン酸CT2584コンジュゲート5.16gを得た。収率 = 88.6%。

【0082】

生成物を、¹H NMRによって特性付けしたところ、N3およびN7のメチル基に対応する3.9ppmおよび3.4ppmでの1重線、ならびにアルキルプロトンに対応する1.24ppmでの幅広い1重線およびCT2584の末端メチル基に対する0.85ppmの幅広いピークが示された。さらにNMRによって、ポリ-L-グルタミン主鎖に対応する1.5ppm~3.0ppmおよび3.5ppm~4.5ppm間の多重線が示された。

【0083】

実施例10. ポリ-L-グルタミン酸-カンプトテシンの調製

20(S)-カンプトテシン(64mg、0.184mmol)とポリ-(L-グルタミン酸)(256mg、49 .8kD)との混合物を6時間真空下で乾燥し、次いで無水ジメチルホルムアミド(15m L)に溶解した。溶液を氷/塩浴中で-5℃まで冷却した。この溶液に、アルゴン下でヨウ化2-クロロメチルピリジニウム(85mg、0.33mmol)およびN,N-ジメチルアミノピリジン(81mg、0.66mmol)を添加した。反応混合物を放置して室温まで一晩加温した。4日後、反応フラスコを再度0℃まで冷却し、10%の塩化ナトリウム溶液(35mL)を25分間かけてゆっくりと添加した。この混合物を0.5N HCL(3.5mL)を用いてpH2.5まで酸性化し、次いで室温でさらに1時間攪拌した。形成された黄色沈殿物を濾過し、水(4×30mL)で洗浄し、次いで12時間真空下で乾燥させた。得られた乾燥黄色濾過ケーキをすりつぶして微細粉末にして、2% MeOH/CH₂Cl₂ (10mL)中に再懸濁し3時間攪拌した。固体を遠心分離によって分離した。この工程を4回繰り返すことで未反応カンプトテシンを除去した。得られた個体を2日間真空下で乾燥することで、PG-20(S)-カンプトテシン(回収したカンプトテシン(13mg)に

基づいた重量バランスによって決定したところ、295mg、収率97%)を得た。¹H NMR(DMSO-d₆において300MHz): δ 12.10(s, -COOH), 6.90-8.80(m), 5.15-5.8(m), 3.10-4.35(m), 1.42-2.62(m), 0.90(br s, 19-CH₃)。バクリタキセルの充填%は、16重量%であった。

【0084】

本発明をその特定の実施形態を参照して説明したが、当業者であれば本発明の趣旨および範囲を逸脱することなく、種々の変更を行うことができ、かつ等価物を代用することができることが理解できるはずである。さらに数多くの改変を行い、本発明の目的とする趣旨および範囲に特定の状況、材料、物質の組成、工程、工程ステップまたはステップを適合させることができる。かかる改変の全ては、本明細書に添付した特許請求の範囲内にあることが意図される。

【0085】

本出願で引用した刊行物、特許出願および特許の全ては、それぞれ個々の刊行物、特許出願または特許が参照によりその全体が組み入れられるべきであると具体的かつ個別的に示されている場合にはそれと同じ程度に、参照によりそれらの全体を本明細書に組み入れる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

例示的なコンジュゲート。

【図2】

ポリ-L-グルタミン酸-バクリタキセルコンジュゲートの製造スキーム。

【図3】

ポリ-L-グルタミン酸バクリタキセルコンジュゲートのプロトンNMRスキャン。

【図4】

ポリ-L-グルタミン酸グリシル-20(S)カンブトテシンの調製。

【図5】

反応スキームI。

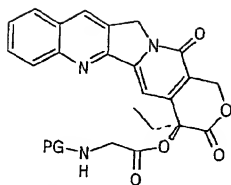
【図6】

反応スキームII。

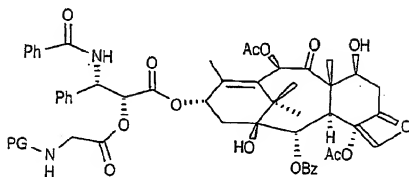
【図7】

反応スキーム III。

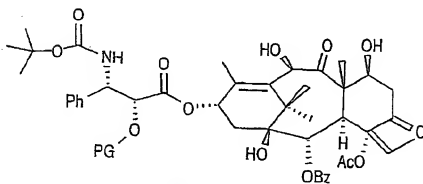
【図1】



ポリ-L-グルタミン酸-グリシル-20 (S) カンプトテシン



ポリ-L-グルタミン酸-2'-(グリシル) バクリタキセル




ポリ-L-グルタミン酸-2'-ドセタキセル


【図2】

製造スキーム

ポリ-L-グルタミン酸ナトリウム塩

- 
1. 水に溶解
 2. 1M HCl を用いて pH2 まで酸性化
 3. 遠心分離によって固体を分離
 4. pH が >3.5 になるまで水で洗浄
 5. 凍結乾燥

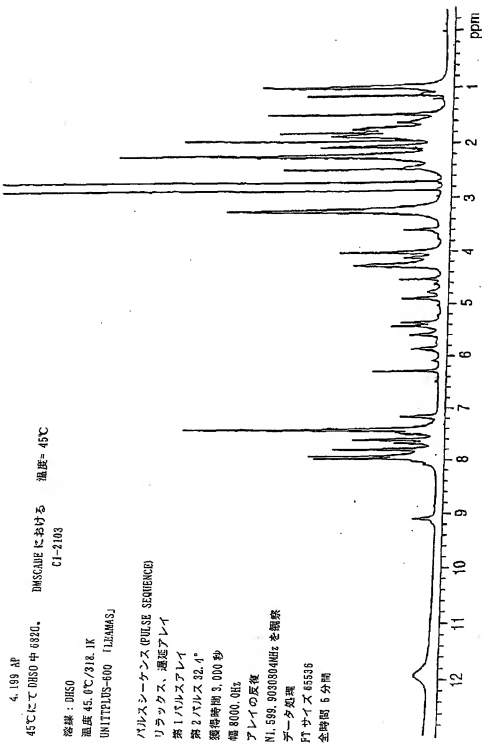
ポリ-L-グルタミン酸

- 
1. バクリタキセル、ジメチルアミノピリジン、ジイソプロピルカルボジイミド、ジメチルホルムアミドを反応が終了するまで攪拌
 2. 10%の NaCl 溶液 (DMF の 2.5 倍容量) で希釈
 3. 濾過
 4. 水で数回洗浄
 5. 凍結乾燥
 6. MeCN を用いてスラリー化
 7. 真空乾燥

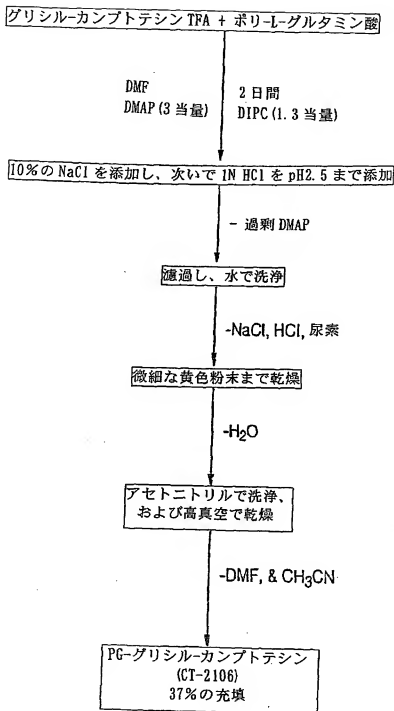
CT 2103

収率 = 10 ロットにおいて平均 87%

【図3】

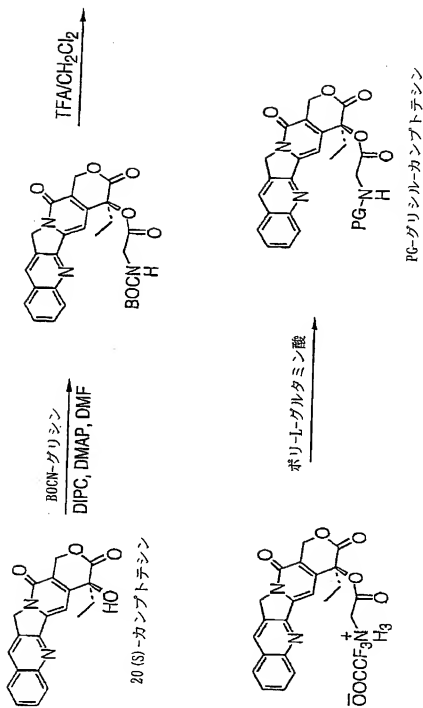


【図4】

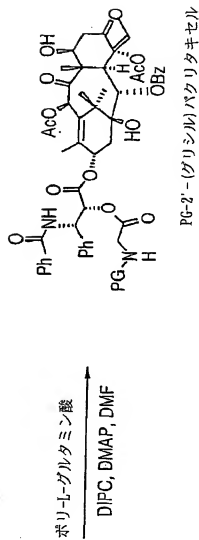
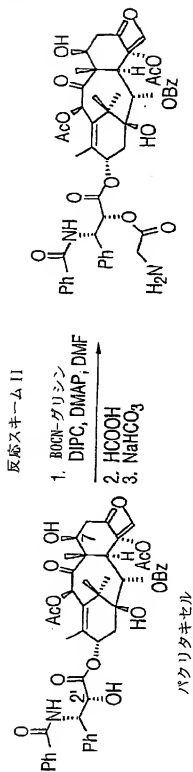


【図5】

反応スキーム I



【図6】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K47/48		Int. Patent Application No. PCT/US 00/28109
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Excluded data base searched during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, EPO-internal, MPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	DUNCAN R ET AL: "Polymer-drug conjugates, POEPT and PELT: basic principles for design and transfer from the laboratory to clinic." JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, (2001 JUL 6) 74 (1-3) 135-46. , XP001023643 abstract; figure 1	1-23
X	SINGER J W ET AL: "Conjugation of camptothecins to poly-(L- glutamic acid)." ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, (2000) 922 136-50. , XP001023451 see discussion page 138; figure 1	1-5, 7-19, 22, 23
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuations of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "I" document which may have priority claims or which is cited to establish the publication date of another claim or other special interest (as indicated) "O" document referring to oral disclosures, oral, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 August 2001		Date of mailing of the international search report 05/09/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5083 Patentpark 2 NL - 2500 MH Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2000, Telex 31 651 ayo nl, Fax: (+31-70) 340-2010		Authorized officer Gonzalez Ramon, N

Form PCT/ISA/210 (unofficial text) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Date: Serial Application No
 PCT/US 00/28109

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Statement to claim No.
X	DE VRIES, PETER (1) ET AL: "Conjugation of docetaxel (DIXL) to poly L- glutamic acid (PG) increases anti-tumor efficacy." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, (MARCH, 2000) NO. 41, PP. 323. MEETING INFO.: 91ST ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, USA APRIL 01-05, 2000 . XP001023482 abstract	1-11, 13-19, 22,23
X	LI C. ET AL: "Complete regression of well-established tumors using a novel water soluble poly(l-glutamic acid)-paclitaxel conjugate" CANCER RESEARCH, vol. 58, 1 June 1998 (1998-06-01), pages 2404-2409, XP001015957 page 2404, column 2, paragraph 2	1-11, 13-23
Y	CONOVER C. D. ET AL: "Camptothecin delivery systems: enhanced efficacy and tumor accumulation of camptothecin following its conjugation to polyethylene glycol via a glycine linker" CANCER CHEMOTHER PHARMACOL., vol. 42, 1998, pages 407-414, XP001023467 abstract	1-23
Y,P	CONOVER C. D.: "Camptothecin delivery systems: the utility of amino acid spacers for the conjugation of camptothecin with polyethylene glycol to create prodrugs" ANTI-CANCER DRUG DESIGN, vol. 14, December 1999 (1999-12), pages 499-506, XP001023559 abstract	11,12
X	WO 97 33552 A (LI CHUN; WALLACE SIDNEY (US); YU DONG FANG (US); WALLACE TECH INC) 18 September 1997 (1997-09-18) claims 2,3,12,19; example 2	1-23
X	WO 99 49901 A (LI CHUN; WALLACE SIDNEY (US); YANG DAVID (US); YU DONG FANG (US);) 7 October 1999 (1999-10-07) figure 1B; examples 1,8	1-23
Y	US 4 356 166 A (GREGONIS DONALD E ET AL) 26 October 1982 (1982-10-26) abstract; claims 4,8,10	1-23

Form PCT/IB/21 (Continuation of previous sheet) (July 2002)

International Application No. PCT/US 03/28109

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/AS/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-5,7-23

Present claims 1-5,7-23 relate to a large number of possible compounds defined as "therapeutic agent" or "antitumor agent". Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds/methods claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Moreover an attempt is made to define the compounds by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the compounds/methods mentioned in the examples and claims 5,6 with due regard to the general idea underlying the present application.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPD policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inventor's Name: Application No.

PCT/US 00/28109

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9733552	A	18-09-1997	
		AU 2580697 A	01-10-1997
		BR 9710646 A	11-01-2000
		CA 2250295 A	18-09-1997
		CN 1217662 A	26-05-1999
		CZ 9802908 A	14-07-1999
		EP 0932399 A	04-08-1999
		HU 9903952 A	28-05-2001
		JP 2000507930 T	27-06-2000
		NO 984210 A	11-11-1998
		PL 328807 A	15-02-1999
		US 6262107 B	17-07-2001
		US 5977163 A	02-11-1999
WO 9949901	A	07-10-1999	
		AU 3455699 A	18-10-1999
		EP 1028756 A	23-08-2000
US 4356166	A	26-10-1982	
		NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

識別記号

F I

キーワード (参考)

A 61 P 35/00

A 61 P 35/00

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 クライン, ジェイ., ピーター

アメリカ合衆国 98070 ワシントン州,
ヴェイション, リッジ ロード エスダブ
リュ 18822

(72)発明者 バット, ラマ

アメリカ合衆国 98155 ワシントン州,
ショアライン, エヌイー 175ディーエ
イチ ストリート 1810

(72)発明者 ヴァウター, エドワード

アメリカ合衆国 98037 ワシントン州,
リンウッド, 425-164ディーエイチ スト
リート ナンバーダブリュ101

Fターム (参考) 4C076 AA84 AA95 CC27 EE41A

EE59A FF32 FF63

4C086 AA01 AA02 BA02 CA01 CB22

MA02 MA05 NA12 NA13 ZB26

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第3部門第2区分
 【発行日】平成17年12月8日(2005.12.8)

【公表番号】特表2003-511423(P2003-511423A)

【公表日】平成15年3月25日(2003.3.25)

【出願番号】特願2001-529754(P2001-529754)

【国際特許分類第7版】

A 61 K 47/48

A 61 K 31/337

A 61 K 31/427

A 61 K 31/4745

A 61 K 47/42

A 61 P 35/00

【F I】

A 61 K 47/48

A 61 K 31/337

A 61 K 31/427

A 61 K 31/4745

A 61 K 47/42

A 61 P 35/00

【手続補正書】

【提出日】平成16年5月18日(2004.5.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

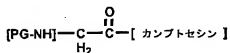
【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の式を有するポリグルタミン酸-カンプトセシンコンジュゲートを含む組成物であって：

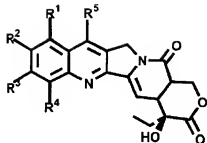


ここで、PGは、ポリグルタミン酸ポリマーであり：

カンプトセシンは、カンプトセシンの20位の酸素を介して結合した、20(S)-カンプトセシンまたは生物学的に活性な20(S)-カンプトセシンアナログであり：

ここで、該20(S)-カンプトセシンアナログは、以下の式であり：

【化2】



ここで、 $R_1 \sim R_4$ の1つ以上が、H以外であり：

【請求項1】が、該ポリグルタミン酸ポリマーのモノマー単位の γ -カルボニル基を介して結合される、
組成物。

【請求項2】 前記P.G.に対する前記カンプトセシンの重量%比が、約1～6.0%である、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】 前記P.G.に対する前記カンプトセシンの重量%比が、約1.0～4.5%である、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】 前記カンプトセシンアナログが、2.0 (S)-カンプトセシン、2.0 (S)-トポテカン、2.0 (S)-9-アミノカンプトセシン、2.0 (S)-9-ニトロカンプトセシン、および7-メチルピペリジノメチル-1.0, 1.1-エチレンジオキシカンプトセシンからなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項5】 前記カンプトセシンアナログが、2.0 (S)-カンプトセシン、2.0 (S)-9-アミノカンプトセシン、2.0 (S)-9-ニトロカンプトセシン、および2.0 (S)-7-エチル-1.0-ヒドロキシカンプトセシンから選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項6】 前記カンプトセシンアナログが、2.0 (S)-カンプトセシンである、請求項5に記載の組成物。

【請求項7】 前記P.G.に対する前記カンプトセシンの重量%比が、3.4%である、請求項6に記載の組成物。

【請求項8】 請求項1に記載のポリグルタミン酸-カンプトセシンコンジュゲートを含む組成物を調製する方法であって、該方法は、以下：

(a) 粘度により決定される約25,000～約60,000ダルトンのMWを有するポリグルタミン酸ポリマー、および該ポリマーへの結合体化のための2.0 (S)-カンプトセシンを提供する工程；ならびに

(b) ポリマー1モルあたり少なくとも5モルの2.0 (S)-カンプトセシンを結合するの十分な条件下で、該2.0 (S)-カンプトセシンを該ポリグルタミン酸ポリマーに共有結合し、それにより該ポリグルタミン酸-カンプトセシンコンジュゲートを形成する工程、

を包含する、方法。

【請求項9】 前記P.G.に対する前記カンプトセシンの重量%比が、1～6.0%である、請求項8に記載の方法。

【請求項10】 前記P.G.に対する前記カンプトセシンの重量%比が、1.0～4.5%である、請求項8に記載の方法。

【請求項11】 前記P.G.に対する前記カンプトセシンの重量%比が、3.4%である、請求項8に記載の方法。

【請求項12】 癌の処置のための薬学的組成物であって、有効量の請求項1に記載のポリグルタミン酸-カンプトセシンコンジュゲート、またはその薬学的に受容可能な塩、ならびに薬学的に受容可能なキャリアおよび/または希釈剤を含む、組成物。

【請求項13】 前記カンプトセシンが、2.0 (S)-カンプトセシンである、請求項12に記載の薬学的組成物。

【請求項14】 前記PGに対する前記カンプトセシンの重量%比が、1～60%である、請求項13に記載の薬学的組成物。

【請求項15】 前記PGに対する前記カンプトセシンの重量%比が、10～45%である、請求項13に記載の薬学的組成物。

【請求項16】 前記PGに対する前記カンプトセシンの重量%比が、34%である、請求項13に記載の薬学的組成物。

【請求項17】 癌を処置するための薬学的組成物であって、該組成物は、このような処置を必要とする患者に投与され、それにより該癌の処置が行われ、該組成物は、有効量の請求項1に記載のポリグルタミン酸-カンプトセシンコンジュゲートまたはその薬学的に受容可能な塩、ならびに薬学的に受容可能なキャリアおよび/または希釈剤を含む、組成物。

【請求項18】 前記カンプトセシンが、2,0(S)-カンプトセシンである、請求項17に記載の薬学的組成物。

【請求項19】 前記PGに対する前記カンプトセシンの重量%比が、1～60%である、請求項18に記載の薬学的組成物。

【請求項20】 前記PGに対する前記カンプトセシンの重量%比が、10～45%である、請求項18に記載の薬学的組成物。

【請求項21】 前記PGに対する前記カンプトセシンの重量%比が、34%である、請求項18に記載の薬学的組成物。